

**PREVALENCIA DE *Plasmodium malariae* EN CUATRO MUNICIPIOS  
ENDÉMICOS PARA MALARIA EN EL DEPARTAMENTO DE  
CÓRDOBA-COLOMBIA**



**JUAN MAURICIO SOTOMAYOR GIL**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
MONTERÍA – CÓRDOBA  
2014**

**PREVALENCIA DE *Plasmodium malariae* EN CUATRO MUNICIPIOS  
ENDÉMICOS PARA MALARIA EN EL DEPARTAMENTO DE  
CÓRDOBA-COLOMBIA**

**JUAN MAURICIO SOTOMAYOR GIL**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al  
título de Bacteriólogo.**

**ASESOR:**

**CARLOS JAVIER CASTRO CAVADIA  
BACTERIÓLOGO  
MAGISTER EN MICROBIOLOGÍA TROPICAL**

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA  
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD  
PROGRAMA DE BACTERIOLOGÍA  
MONTERÍA – CÓRDOBA**

**2014**

**El Jurado calificador del trabajo no será responsable de las ideas  
emitidas por los autores (Articulo 46, Acuerdo 006 de mayo de 1979)  
(Consejo Directivo)**

**NOTA DE ACEPTACIÓN**

---

---

---

---

**Presidente del Jurado**

---

**Jurado**

**Montería, Noviembre de 2014**

## DEDICATORIA

*“Este trabajo va dedicado principalmente a todos aquellos que permitieron su desarrollo, en primera instancia a Dios por ser la fuente de sabiduría, a mi familia por brindarme su apoyo en cada momento de esta carrera, al Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas, a la Universidad de Córdoba mi “Alma Mater Cordobesa”, al Programa de Bacteriología y a todos y cada uno de aquellos que pusieron granito de arena en el desarrollo de este trabajo, y sin duda no puedo dejar por fuera a todos aquellos que creyeron en mí y me brindaron su apoyo para que eso que un día fue un sueño, hoy sea una realidad. Hoy puedo decir: EBENEZER, hasta aquí me ha ayudado Dios.*

*“... Y a Aquel que es poderoso para hacer todas las cosas mucho más abundantemente de lo que pedimos o entendemos”*

*Efesios 3:20a*

***Juan Mauricio Sotomayor Gil***

## **AGRADECIMIENTOS**

Mis agradecimientos primeramente a Dios, fuente de salud, sabiduría e inteligencia, sin Él a la cabeza nada de esto hubiera sido posible.

Al Grupo de Investigaciones Microbiológicas y Biomédicas de Córdoba en cabeza de su directora la Dra. María Fernanda Yasnot, gracias por su orientación, por ser mi maestra y ayudarme a crear una pasión por la ciencia y la investigación. A cada uno de sus miembros: Don Gustavo Quintero, Doña Virginia Rodríguez, a mis compañeros (as) de batalla María Camila, Paula, Andrés, Mayra, Carlos Eliezer, Cindy, Yeliana, gracias por aguantarse todos los días mis escándalos, desordenes, risas y demás, sin ustedes no cabe duda, esto no hubiera sido igual.

A mi Asesor pero sobre todo Amigo, Carlos Castro Cavadía, una gran persona, inteligente y voluntario, gracias por tenerme paciencia, tu ayuda fue fundamental en este proceso.

A mis padres Juan O. Sotomayor y Bienvenida Gil, mis hermanos, mis sobrinos, mis primos y mis tíos, ustedes son el motor de mi vida. Gracias por su apoyo, hoy puedo decir que nunca me faltó cariño, comprensión, motivación y apoyo.

**¡Gracias!**

## CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>1. MARCO REFERENCIAL</b>   | 14   |
| 1.1. Epidemiología de la Malaria en el Mundo  | 14   |
| 1.2. La malaria en Colombia y Córdoba   | 17   |
| 1.3. Curso de la Enfermedad   | 18   |
| 1.4. Ciclo de vida de <i>Plasmodium sp.</i>   | 21   |
| <b>2. OBJETIVOS</b>   | 23   |
| 2.1. Objetivo General   | 23   |
| 2.2. Objetivos Específicos  | 23   |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  | 24   |
| 3.1. Localización   | 24   |
| 3.2. Definición de variables  | 25   |
| 3.3. Tipo y diseño general del estudio  | 25   |
| 3.4. Población de estudio   | 25   |
| 3.5. Muestra  | 25   |
| 3.6. Criterios de Selección   | 26   |
| 3.6.1. Criterios de inclusión   | 26   |
| 3.6.2. Criterios de exclusión   | 26   |
| 3.7. Confirmación microscópica de infección por <i>Plasmodium vivax</i> y estimación de la densidad parasitaria     | 27   |
| 3.8. Extracción de ADN parasitario  | 27   |
| 3.9. Determinación de la especie de <i>Plasmodium</i>   | 28   |
| 3.10. Clonación de los productos amplificados de ADN genómicos de <i>Plasmodium malariae</i> para control positivo. | 28   |
| 3.11. Análisis Estadístico  | 29   |
| 3.12. Aspectos éticos   | 30   |
| 3.13. Mantenimiento de la información   | 30   |
| 3.14. Análisis de la información socio-demográfica  | 30   |
| 3.15. Plan de Análisis  | 31   |

|   |    |
|---|----|
| 3.16. Confidencialidad  | 31 |
| 3.17. Cronograma de actividades                                 | 31 |
| <b>4. RESULTADOS</b>  |    |
| 4.1. Estandarización de nmPCR con primers de <i>P. malariae</i> | 32 |
| 4.2. Procedencia de las muestras                                | 33 |
| 4.3. Niveles de parasitemia                                     | 33 |
| 4.4. Resultados de nmPCR por especie                            | 34 |
| 4.5. Caracterización de la población por sexo                   | 35 |
| 4.6. Caracterización de la población por edad                   | 36 |
| <b>5. DISCUSIÓN</b>   | 38 |
| <b>6. CONCLUSIONES</b>  | 40 |
| <b>7. RECOMENDACIONES</b>                                       | 41 |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍAS</b>   | 42 |
| <b>9. ANEXOS</b>  |    |

## INDICE DE TABLAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Tabla 1.</b> Datos geográficos y ambientales de la región de<br>Estudio | 24          |
| <b>Tabla 2.</b> Número de muestras recolectadas por municipio              | 26          |
| <b>Tabla 3.</b> Secuencia de primers específicos para cada especie         | 29          |
| <b>Tabla 4.</b> Distribución de la población                               | 33          |
| <b>Tabla 5.</b> Relación entre procedencia y niveles de parasitemia        | 34          |
| <b>Tabla 6.</b> Distribución de la población por sexo y procedencia        | 36          |
| <b>Tabla 7.</b> Clasificación de la población según la edad                | 36          |



## INDICE DE FIGURAS

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| Figura 1. Distribución mundial de la Malaria                                       | 15          |
| Figura 2. Comportamiento de la malaria en Colombia<br>2012-2013                    | 16          |
| Figura 3. Condiciones de riesgo para malaria en Córdoba                            | 17          |
| Figura 4. Ciclo de vida de <i>Plasmodium spp.</i>                                  | 20          |
| Figura 5. Áreas geográficas de procedencia de las muestras                         | 24          |
| Figura 6. Esquema del vector pGEN-T Easy (Promega) con<br>resistencia a ampicilina | 28          |
| Figura 7. Gel de Electroforesis, revelado de nmPCR                                 | 32          |
| Figura 8. Resultados de las muestras por <i>nmPCR</i>                              | 34          |
| Figura 9. Relación entre procedencia y especies parasitarias                       | 35          |
| Figura 10. Distribución de la población por sexo                                   | 35          |
| Figura 11. Relación entre edad y sexo de la población                              | 37          |

## RESUMEN

*Plasmodium malariae*, es el parásito responsable de la malaria cuartana, está descrito que se transmite en áreas con gran endemividad y está asociado con una morbilidad significativa. *Plasmodium malariae*, es comúnmente confundida en la morfología de algunas de sus formas parasitarias en la gota gruesa con *Plasmodium vivax*. Son pocos los estudios tanto epidemiológicos como clínicos reportados en esta especie de *Plasmodium*. Existen reportes de prevalencia de *P. malariae* en Asia, Tailandia, Brasil y Venezuela. El propósito de este estudio fue determinar el patrón de comportamiento de la malaria por *P. malariae* en cuatro municipios endémicos de malaria en Córdoba-Colombia durante un año. Para tal fin se colectaron muestras de sangre en papel filtro de 220 pacientes con diagnóstico previo de malaria por *Plasmodium vivax*, además se realizó confirmación microscópica de infección única por *P. vivax* por gota gruesa, extendido de sangre periférica y confirmación molecular por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa anidada multiplex (nmPCR). Se definieron como variables de interés a partir de la información obtenida de las fichas clínico-epidemiológicas de los pacientes, la distribución de los casos según edad, sexo y procedencia. Los datos obtenidos se tabularon en Excel y luego se analizaron por medio de estadística descriptiva en el programa SPSS Versión 18. No se encontró *Plasmodium malariae* en las muestras analizadas. Se logró estandarizar un protocolo de clonación del ADN de *Plasmodium malariae*, obteniendo un ADN plasmídico en el que quedó incluido el fragmento de interés para su uso como control positivo en el diagnóstico molecular de esta especie por nmPCR.

## ABSTRACT

*Plasmodium malariae*, is the parasite responsible for quartan malaria, is described that the parasite is transmitted in highly endemic areas and is associated with significant morbidity. *Plasmodium malariae*, is commonly confused with *Plasmodium vivax*. There are few epidemiological and clinical studies about this species of *Plasmodium* around the world. The principal reports of prevalence for *P. malariae* are in Asia, Thailand, Brazil and Venezuela. The purpose of this study was to determine the pattern of behavior of *P. malariae* in four malaria endemic municipalities in Córdoba-Colombia for a year. For this purpose blood samples from 220 patients, taken on filter paper, also *P. vivax* microscopic confirmation with thick smears and thin smear was made and molecular confirmation by multiplex nested polymerase chain reaction (nmPCR) technique. The distribution of cases by age, gender and origin were defined as variables of interest from the information obtained by clinical – epidemiological profile. The data were tabulated in Excel and then analyzed using descriptive statistics in SPSS version 18 program. No *Plasmodium malariae* was found in the samples analyzed. With this investigation was standardized a DNA of *Plasmodium malariae* cloning protocol, obtaining a plasmidic DNA with the fragment of interest inside, for use as a positive control in diagnostic molecular for nmPCR.

## INTRODUCCIÓN

La malaria es considerada la enfermedad parasitaria que mayor número de muertes causa en el mundo, según la Organización Mundial de la Salud en promedio 2.1 millones de personas mueren actualmente a causa de esta. La enfermedad es producida tras la picadura de la hembra infectada del mosquito *Anopheles* la cual inocula el parásito del género *Plasmodium*, apareciendo los síntomas solo hasta 21-25 días después de la infección (Wyler 1993).

Entre las principales especies productoras de malaria en humanos se encuentran *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* y por último *Plasmodium knowlesi* del cual solo hasta hace poco se logró comprobar su afectación a humanos (Tangpukdee N., et al, 2006).

*Plasmodium malariae* es el único reconocido como el causante de infecciones asintomáticas por décadas. Generalmente las infecciones asintomáticas por esta especie están típicamente asociadas con bajos niveles de parasitemias y evaluaciones físicas normales (Guerrero IC, et al, 1983). Los pacientes con *P. malariae* han presentado anormalidades de tipo renales, incluso se han reportado casos en los que la infección esta íntegramente relacionada con glomerulonefritis, asimismo afectaciones menores en el perfil hepático, con aumento de los niveles de bilirrubina, aminotransferasas y fosfatasa alcalina e hipoalbuminemia (Tangpukdee N., et al, 2006)

*Plasmodium malariae* es el principal objeto de estudio en esta investigación; partiendo de la importancia de un buen diagnóstico y la similitud microscópica que tiene con *Plasmodium vivax*, se propone la diferenciación de estas dos especies mediante procesos de biología molecular como la Reacción en Cadena de la Polimerasa multiplex

anidada (mnPCR). Todo lo anterior enfocado en el Departamento de Córdoba – Colombia donde en lo que va corrido del 2014 se han reportado 1243 casos de malaria (SIVIGILA, 2014).

La nmPCR consiste en la amplificación de un fragmento de 1.6-1.7kb del gen 18sRNA común para todas las especies, en segunda instancia se amplifica una región que codifica específicamente para la especie, esto usando primers únicos para cada una de ellas.

Con este estudio se busca determinar el patrón de comportamiento de la especie *Plasmodium malariae* en los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelibano y Moñitos, y lograr la caracterización socio-demográfica de la población.

En la actualidad eexisten pocos estudios epidemiológicos y clínicos realizados en Colombia que puedan demostrar la situación actual de las áreas endémicas en cuanto a la transmisión de *Plasmodium malariae* en el país y específicamente en un área de alto riesgo como es la del Urababajo Cauca sur Córdoba, sus características clínicas y moleculares que puedan estar afectando a la población. Por lo tanto, se hace necesario conocer la frecuencia de *P. malariae* en estos cuatro municipios considerados endémicos en el departamento de Córdoba.

Este tipo de estudios permite en primera instancia conocer el comportamiento epidemiológico de la infección por esta especie y de malaria mixta, además será la base para estudios de resistencia a medicamentos y facilita la evaluación de su acción potencializadora en la patogénesis en los casos de infecciones mixtas, además aclara el diagnóstico de las infecciones por *P. malariae*, diagnosticadas como *P. vivax* y a su vez motiva la realización de estudios similares en otras regiones del país.

## 1. MARCO REFERENCIAL

La malaria es una enfermedad que representa una amenaza para la vida humana no solo por la alta morbilidad y mortalidad, sino porque también genera un gran impacto socio-económico en los países sub-tropicales y tropicales donde la enfermedad es altamente endémica. Además, es considerada una enfermedad re-emergente en diversas áreas del mundo, donde se pensaba inicialmente erradicada durante la campaña de erradicación en la década de los 60's (CDC, 2010).

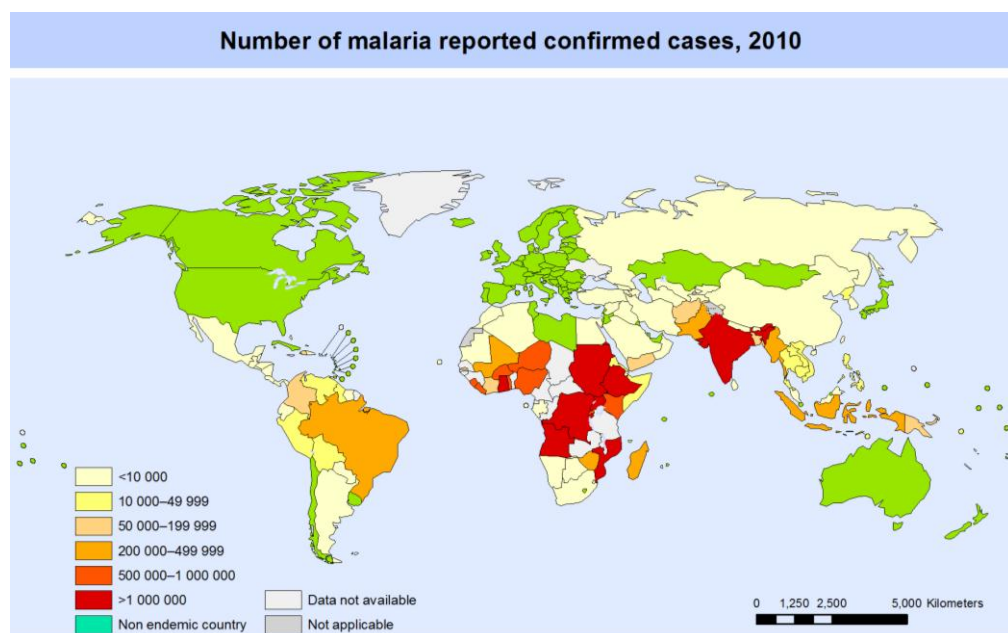
### 1.1. Epidemiología de la malaria en el mundo

Esta enfermedad, es causada por un parásito protozoario del género *Plasmodium* dentro del cual existen cuatro especies que infectan al hombre: *P. ovale*, *P. malariae*, *P. falciparum* y *P. vivax*, siendo las dos últimas las que causan el mayor porcentaje de casos en el mundo, pero *P. falciparum* tiene mayor relevancia debido a su amplia distribución, gran virulencia y mortalidad (Trigg et al, 1998) La malaria está ampliamente distribuida, actualmente hay 108 países con malaria, aproximadamente 3.300 millones de personas expuestas en el mundo, con más de 300-500 millones de casos que son reportados alrededor del mundo, y 1.5-2.7 millones de personas mueren a causa de esta enfermedad cada año, 85% de éstas en niños menores de 5 años (Figura 1). (WHO, 2013).

En el continente africano la transmisión es principalmente por infecciones causadas por *P. falciparum* en donde hay entre 300- 500 millones de casos y más de 2 millones de muertes anualmente. En el continente americano, la región latinoamericana es la más afectada, con aproximadamente un 50% de su población total (225 millones) viviendo bajo algún riesgo de transmisión de malaria. Teniendo en cuenta al alto subregistro, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) considera que se producen anualmente un millón de casos con un predominio significativo de *P. vivax* (55%) (PAHO 2010).

En los años 70 existía un ligero predominio de infecciones por *Plasmodium falciparum*, en Latinoamérica, pero a partir de 1974 los casos de malaria por *P. vivax* se han venido incrementando gradualmente (Greenwood and Alonso 2002). En Centro América y en el Sur de México, existen áreas endémicas para malaria en zonas de baja altitud, tales como Honduras, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica y Panamá. Para el año 2002 se reporto que 5 de cada 1000 personas presentaron la enfermedad de los cuales cerca de la mitad provenían de Brasil y Colombia (PAHO 2003).

A partir del 2000 la Organización Panamericana de la Salud ha reportado un descenso considerable de la malaria en las Américas, los casos literalmente se redujeron a la mitad entre esta época y el año 2008



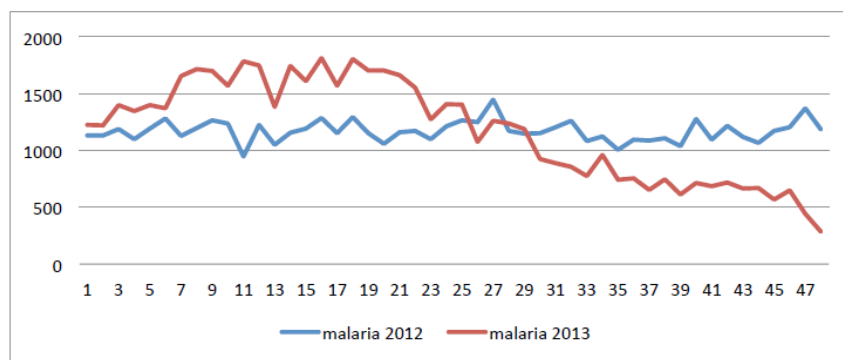
**Figura 1.** Distribución mundial de la malaria por número de casos reportados. Fuente: Organización Mundial de la Salud, 2012

### La malaria en Colombia y Córdoba

En Colombia, aproximadamente el 85% del territorio presenta condiciones ecológicas para la transmisión de malaria; sin embargo, debido a que la

mayoría de la población se concentra en las cordilleras, no se observa una amplia transmisión de la enfermedad. Por lo tanto, las regiones del país con mayor riesgo son las de la Costa Pacífica, Llanos Orientales y Amazonia.

Durante el año 2014 en el país hasta la semana epidemiológica N°42 se presentaron 31.425 casos de los cuales el 49.6%% (15.588 casos) fueron causados por *P. vivax*, el 48.9% (aprox. 15.384 casos) por *P. falciparum* y por *P. malariae* el 0.02% (aprox. 8 casos) (SIVIGILA, 2014). Adicional en años anteriores la malaria ha presentado un leve aumento en los casos notificados al Instituto Nacional de Salud, sin embargo la cifra no supera el 2% de variación. (figura 2) (INS, 2013).

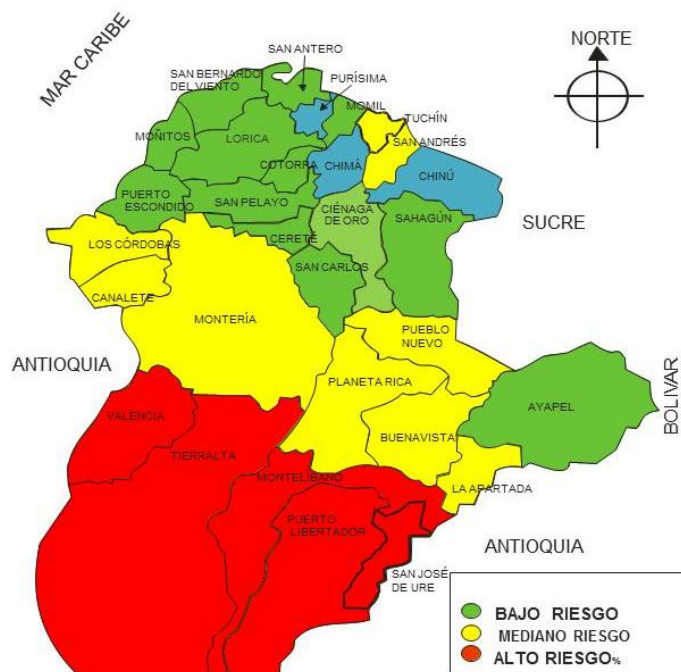


**Figura 2.** Comportamiento de la malaria en Colombia, 2012 – 2013.

Fuente: Instituto Nacional de Salud de Colombia, 2013.

En el departamento de Córdoba, existen zonas que han sido catalogadas con alto riesgo para malaria (Figura 3), donde miles de personas se encuentran expuestas a la infección, principalmente en las áreas rurales. Córdoba aportó durante el 2014 a cohorte de la Semana 42, 1208 casos de malaria, equivalentes a un 3,84% del consolidado nacional, siendo Tierralta el municipio que más casos reporta (SIVIGILA, 2014).





**Figura 3.** Condiciones de riesgo para malaria en el Departamento de Córdoba  
Fuente: Secretaría de Desarrollo de la Salud, Córdoba - Colombia

*Plasmodium malariae* es el segundo agente productor de malaria en el África occidental, y su registro en el mundo ha sido algo subestimado. Algunos autores dicen que la baja cantidad de estudios relacionados con esta especie es a causa de la baja prevalencia de este parásito en la mayoría de las regiones del mundo. Su similitud microscópica con la especie predominante (*P. vivax*) ha contribuido a que éste permanezca enmascarado, así como el uso de antimaláricos, el cual es común para ambas especies. (Hans-Peter *et al*, 2014)

## 1.2. Curso de la enfermedad

En particular, la infección por *Plasmodium malariae* usualmente es de curso crónico y asintomática y por lo general cursa con una carga baja de parásitos en sangre, se estima que en la mayoría de los casos no supera los 5000 parásitos por uL (Collins *et al*, 2007)

Sin embargo, algunos estudios han demostrado la relación que existe entre *Plasmodium malariae* y la aparición de nefropatías agudas asociadas a inmunocomplejos. Esto deja sin valor las afirmaciones

hechas por algunos autores, quienes incluso señalaban la ausencia del parásito en varias regiones. (Hedelius et al, 2011)

Es tal la situación que se presenta principalmente en África occidental relacionada con esta especie de *Plasmodium* que incluso ya se han reportado casos de resistencia a Cloroquina, el cual se convierte en el tratamiento de primera línea para *P. malariae* (Yun Ji et al, 2012)

Con relación al reporte en Colombia del Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública en el que ha recibido notificación hasta la semana epidemiológica 42 de 2014, ocho casos de malaria por *Plasmodium malariae*, la situación que permite reafirmar la tesis planteada. Sin embargo se desconoce el método diagnóstico implementado para la confirmación de especie. Adicional a ello, en Córdoba fue diagnosticado un caso por esta especie parasitaria que al final fue depurada hacia el departamento de Antioquia, ya que según la Secretaría de Salud de Departamental se trató de un caso importado.

### **1.3. Ciclo de Vida de *Plasmodium* sp.**

El entendimiento de la transmisión y patogénesis de esta enfermedad ha evolucionado considerablemente. Una apreciación del ciclo de vida y de la fisiopatología de la infección es la clave para entender el proceso de la malaria.

El ciclo de vida del parásito incluye como huéspedes al mosquito y al humano, tal como lo muestra la figura 4. Los climas cálidos con alta humedad y abundantes lluvias crean las condiciones favorables para los mosquitos, incrementando las áreas de apareamiento y la supervivencia, además facilitando la transmisión.

La malaria se inicia a partir de la picadura de un mosquito *Anopheles* hembra infectado, que inyecta los esporozoitos en el tejido subcutáneo

del hospedero vertebrado. Se calcula que aproximadamente en 30 minutos, los esporozoitos inoculados llegan al hígado e invaden los hepatocitos. Aquí el parásito inicia la reproducción asexual (esquizogonia) y el desarrollo de esquizontes pre-eritrocíticos tisulares; un estadio del parásito que contiene cientos de merozoítos (Wyler 1993).

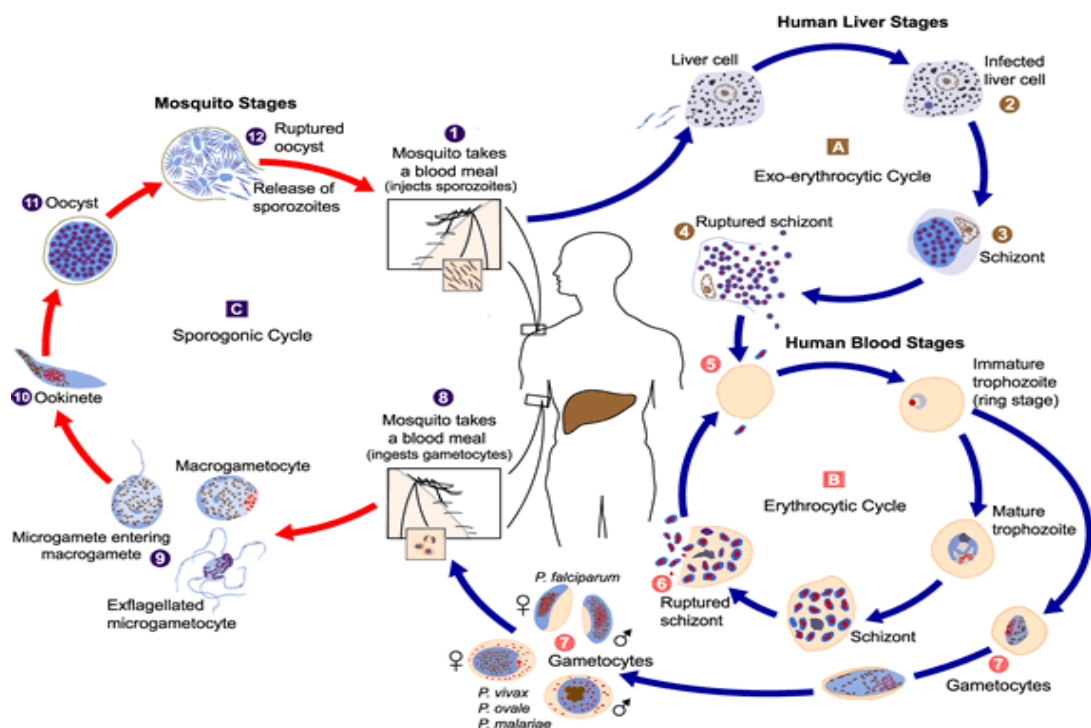
Esta etapa es completamente asintomática y en los humanos puede durar aproximadamente entre 5 y 15 días, dependiendo de la especie del parásito. En la etapa pre-eritrocítica de *P. vivax* y *P. ovale*, algunos esporozoítos se pueden transformar en hipnozoítos que permanecen latentes por meses e incluso por años, siendo responsables de las posteriores recaídas (Krotoski 1985; Mendis and Carter 1995).

Con la ruptura de los hepatocitos infectados, los merozoítos son liberados en el torrente sanguíneo e invaden eritrocitos. Cada especie de parásito tiene una característica específica para infectar eritrocitos maduros y/o inmaduros. *P. falciparum* tiene preferencia por glóbulos rojos maduros y utiliza receptores de ácido siálico durante el proceso de invasión mientras que *P. vivax* utiliza el grupo sanguíneo Duffy (Miller et al., 1976). Después de la invasión de los eritrocitos, el merozoíto se diferencia a trofozoíto que, posteriormente, se desarrolla en esquizonte sanguíneo. La ruptura del eritrocito libera merozoítos que son capaces de invadir más eritrocitos, empezando un nuevo ciclo. Esto permite que el número de eritrocitos infectados aumente logarítmicamente.

En los humanos, el tiempo del desarrollo eritrocítico puede ser entre 48 y 72 horas y el número de merozoítos varía de 8 a 32 dependiendo de la especie de *Plasmodium*. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad están asociadas con la ruptura de los glóbulos rojos infectados. Un porcentaje pequeño de merozoítos, se diferencian a formas sexuales, macro (hembra) y micro (macho) gametocitos, los cuales son tomados por un nuevo mosquito e inician el ciclo esporogónico (Figura 4).

En el intestino medio del mosquito se lleva a cabo la exflagelación de los microgametocitos entre 30 y 60 minutos después de la alimentación y cada macrogameto recibirá un microgameto formando así el cigoto entre 1-8 horas después de la infección. Posteriormente, este se alarga y toma una forma vermiforme, en esta etapa se denomina ooquineto y este proceso se lleva a cabo entre 9 y 24 horas. El ooquineto penetra las células epiteliales que cubren el intestino medio y se localiza debajo de la lámina basal de la pared externa del intestino. Posteriormente, 24 a 36 horas después de la infección, se forma el ooquiste inmaduro.

A los 7-8 días post-infección los ooquistes se encuentran maduros y de ellos salen los esporozoitos, los cuales van al hemocele y por medio de la hemolinfa migran a las glándulas salivales. Cuando el mosquito se alimenta, los fluidos salivales que transportan los esporozoitos son inoculados en el mosquito en el hospedero para reiniciar el ciclo (Figura 4) (Sinden 1999).



**Figura 4.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp.

Fuente; CDC, 2010.

#### 1.4. Fisiopatología de la Infección

La patogénesis de malaria por *P.falciparum* es la mejor entendida, y muchos factores contribuyen a la severidad de la enfermedad. Las altas cargas de parásitos combinadas con la habilidad única de eritrocitos infectados para adherirse a las paredes del endotelio contribuye a la oclusión de la microvasculatura, el deterioro metabólico y la acidosis; todo esto conduce a las manifestaciones clínicas de la malaria severa (síndrome de distrés respiratorio agudo, insuficiencia renal y malaria cerebral). Además una importante respuesta de citoquinas a las proteínas liberadas por el parásito durante la ruptura de los esquizontes puede contribuir a una respuesta clínica adversa.

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad pueden estar relacionadas con hemólisis intravascular y consumo de glucosa por el parásito. Los factores del huésped tales como la anemia de células falciformes y deficiencia de glucosa 6 fosfato deshidrogenada puede modificar la severidad de la enfermedad. Las infecciones causadas por *P.vivax*, *P.ovale* y *P. malarie* son generalmente moderadas en relación a la malaria por *falciparum*; los síntomas están relacionados con la carga parasitaria y la liberación de citoquinas, debido a que el fenómeno de vaso-oclusión no se presenta.

La malaria comúnmente presenta una enfermedad febril aguda sistémica y puede tener otras manifestaciones como anemia crónica, glomerulonefritis o síndrome de esplenomegalia tropical, causados por *P. falciparum*, *P. vivax* o *P. malariae* (Krogstad DJ., 1995)

Aunque que todos los parásitos de malaria humana causan una enfermedad aguda que puede estar acompañada con esplenomegalia, *Plasmodium malariae* es el único reconocido como el causante de infecciones asintomáticas por décadas. Las infecciones de *Plasmodium malariae* asintomáticas están típicamente asociadas con bajos niveles de

parasitemias y evaluaciones físicas normales y en la mayoría de los casos la atención médica se presenta cuando la malaria es transmitida por transfusión (Guerrero IC, et al, 1983; Bruce-Chwatt LT, 1972). Adicionalmente, pacientes con *P. malariae* han presentado anormalidades menores en el perfil hepático, con aumento de los niveles de bilirrubina, aminotransferasas y fosfatasa alcalina e hipoalbuminemia (Tangpukdee N., et al, 2006)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general.**

Determinar el patrón de comportamiento de malaria por *P. malariae* en cuatro municipios endémicos de malaria en Córdoba-Colombia durante un año.

### **2.2. Objetivos específicos.**

1. Demostrar la presencia de *P. malariae* en los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano y Moñitos en el departamento Córdoba-Colombia.
2. Determinar la prevalencia de *Plasmodium malariae* en los municipios Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano y Moñitos en el departamento Córdoba-Colombia.
3. Evaluar la distribución de los casos según edad, sexo y procedencia

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

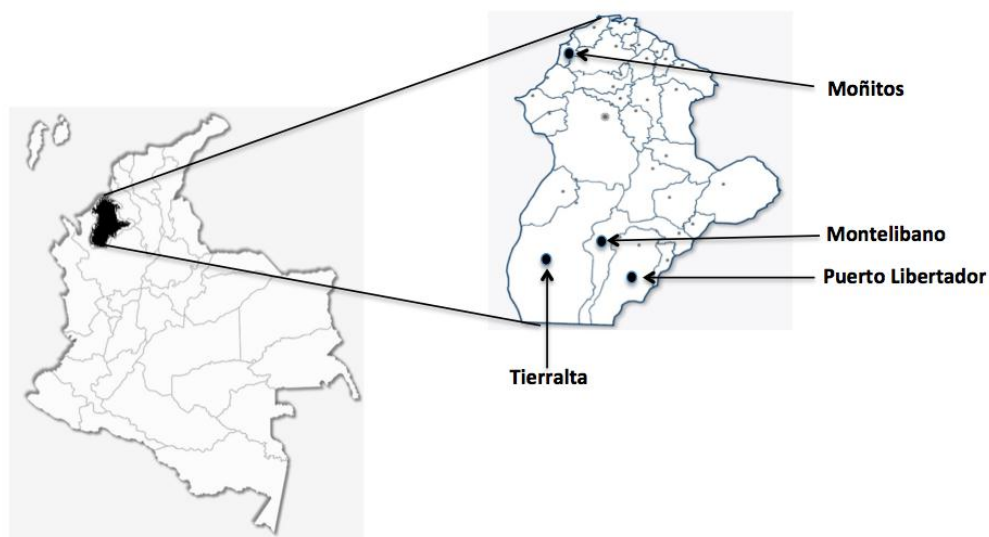
#### 3.1. Localización

La recolección de muestras se realizó en los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelibano, Moñitos y Tuchin (Figura 5), cuyos datos geográficos y ambientales se detallan a continuación:

**Tabla 1.** Datos geográficos y ambientales de las regiones de estudio

| Municipio         | Población estimada | Extensión             | Coordenadas               | Longitud oeste | Temperatura promedio | Altura sobre el nivel del mar |
|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|----------------|----------------------|-------------------------------|
| Tierralta         | 48.666             | 4.728 Km <sup>2</sup> | Latitud Norte 08° 10' 34" | 76° 03' 46"    | 27 °C                | 5 mts                         |
| Puerto Libertador | 35.186             | 2.063 Km <sup>2</sup> | Latitud Norte 07° 53' 53" | 75° 40' 25"    | 27 °C                | 90 mts                        |
| Montelibano       | 85.000             | 1.899 Km <sup>2</sup> | Latitud Norte 07° 59' 30" | 75° 25' 30"    | 28 °C                | 50 mts                        |
| Moñitos           | 23.653             | 206 Km <sup>2</sup>   | Latitud Norte 09° 14' 00" | 76° 07' 50"    | 28 °C                | 5 mts                         |

**FUENTE:** DANE, 2010.



**Figura 5.** Áreas geográficas de procedencia de las muestras.

**Modificado:** Página web Gobernación de Córdoba



### **3.2. Definición de variables**

Se consideraron como independientes y asumieron los valores o categorías como el sexo (femenino o masculino), edad (en años), densidad parasitaria (Parásitos/uL de Sangre), etc.

### **3.3. Tipo y diseño general del estudio**

Este estudio es de tipo descriptivo analítico, de corte transversal en donde se determinó el patrón de comportamiento de malaria por *P. malariae*, en cuatro municipios endémicos de malaria del departamento de Córdoba – Colombia durante un periodo de 12 meses, contados a partir de la aprobación y legalización de la ejecución del proyecto.

### **3.4. Población de estudio**

La población de estudio la conformaron el total de pacientes con diagnóstico confirmado de malaria, por examen clínico y gota gruesa positiva, atendidos en las instituciones de salud de los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano y Moñitos, previo consentimiento informado.

### **3.5. Muestra**

Para la obtención de ADN parasitario, se tomaron 220 muestras de sangre periférica en papel filtro tipo Whatman N°3 de pacientes con diagnóstico previo por gota gruesa de infección por *Plasmodium vivax* provenientes de diferentes municipios del departamento de Córdoba: Tierralta, Puerto Libertador, Montelibano, Moñitos (Tabla 2). Previo a la toma de la muestra, los pacientes fueron informados del propósito de la investigación y dieron su consentimiento por escrito.

**Tabla 2.** Número de muestras recolectadas por municipio

| Municipio         | Número de muestras recolectadas |
|-------------------|---------------------------------|
| Tierralta         | 65                              |
| Puerto Libertador | 79                              |
| Montelibano       | 54                              |
| Moñitos           | 22                              |
| <b>Total</b>      | <b>220</b>                      |

### **3.6. Criterios de Selección**

#### **3.6.1. Criterios de inclusión**

- Todo paciente con diagnóstico confirmado de malaria, por examen clínico y gota gruesa positiva que sea atendido en las instituciones de salud de los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano y Moñitos durante el periodo de estudio.
- Aceptación y firma del consentimiento informado del paciente o familiar responsable, en pacientes menores de edad

#### **3.6.2. Criterios de exclusión**

- Todo paciente con diagnóstico probable de malaria, con gota gruesa negativa que sea atendido en las instituciones de salud de los municipios de Tierralta, Puerto Libertador, Montelíbano y Moñitos durante el periodo de estudio.
- No aceptación, ni firma de consentimiento informado de la participación en la investigación por parte del paciente, o familiar responsable.

### **3.7. Confirmación microscópica de infección por *P. vivax* y estimación de la densidad parasitaria**

La confirmación microscópica de infección por *P. vivax* y la estimación de la densidad parasitaria se realizó de acuerdo con la definición del

Protocolo de Vigilancia y Control de Malaria del Instituto Nacional de Salud (INS) de Colombia (INS, 2011)

### **3.8. Extracción de ADN parasitario**

La extracción de ADN parasitario se realizó a partir de muestras de sangre contenidas en papel de filtro (Watman 3), usando el método de Chelex/Saponina (Guerra *et al.*, 2006). Esta técnica consistió en cortar un pedazo de la muestra obtenida en papel filtro, se adicionó 1 ml de PBS 1X y 50 µl de saponina al 10% e incubó durante toda la noche a 4 °C. Al día siguiente se centrifugaron los tubos a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C, posteriormente se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) 1X por 30 minutos a 4 °C; se centrifugó a 10000 rpm por 5 min a 4 °C, luego se aspiró tanto líquido como fue posible y se descartó, con la misma punta se llevó el papel al fondo del tubo sin empaquetar.

Posteriormente se adicionó 100 µl de H<sub>2</sub>O *milli Q* a cada tubo; luego se adicionó 50 µl de Chelex a cada tubo para extraer el ADN de la muestra y se incubaron los tubos con la mezcla a 95 °C por 10 min, se mezcló fuertemente con vortex con intervalos de 2 min durante toda la incubación; se centrifugaron los tubos a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente (~25 °C); luego se transfirió toda la solución a un tubo marcado (A), sin destruir el papel; nuevamente se centrifugaron los tubos A a 13000 rpm por 5 min a temperatura ambiente (~25 °C) y se transferió el sobrenadante a un tubo B sin tomar el Chelex que se encuentra en el fondo. El ADN se distribuyó en alícuotas de 30 µl y se almacenó a -20 °C hasta el momento de la realización de las pruebas moleculares. (Anexo 1)

### **3.9. Determinación de la especie de *Plasmodium***

Para confirmar molecularmente la especie de *Plasmodium* se realizó una PCR anidada multiplex, siguiendo los protocolos descritos previamente por Snounou *et al.* y Singh *et al.* (Snounou *et al.*, 1993. Singh *et al.*, 1999) un

producto de amplificación del gen 18S rRNA de 120 pb específico para *P.vivax*, uno de 205 pb para *Plasmodium vivax* y uno de 144 pb específico para *Plasmodium malariae*. Los primers y las condiciones de amplificación se muestran en la Tabla 3. (Anexo 2)

### 3.10. Clonación de los productos de amplificación del ADN genómico de *Plasmodium malariae*, para control positivo

Los productos de amplificación del ADN genómico de *Plasmodium malariae* se clonaron en el vector “pGEM®-T Easy Vector” (Promega) (Figura 6), y se transformaron en la cepa XLBlue de *E. coli*, siguiendo el protocolo indicado por la casa comercial ([www.promega.com](http://www.promega.com)).

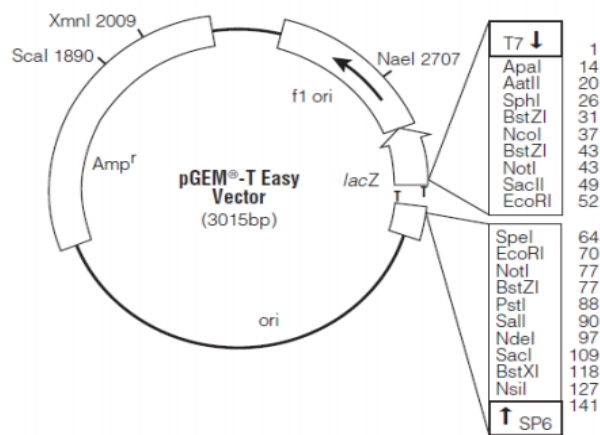


Figura 6 : Esquema del vector pGEM-T Easy (Promega), con resistencia a ampicilina.

A continuación, se ligaron el producto de PCR purificado y el vector linearizado con ADN ligasa T4 de Promega. La mezcla de ligación se incubó durante 3 horas a temperatura ambiente y se utilizó para transformar células competentes de la cepa citada. Para seleccionar las bacterias que contienen el plásmido recombinante, se usó el medio selectivo LB (Luria Bertani) con X-gal (5-bromo-4-cloro-3- indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido), ampicilina e IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido), como propone el protocolo de la casa comercial, seleccionándose las colonias de color blanco.

**Tabla 3.** Secuencia de primers específicos para cada especie

| Especie              | Primer | Secuencia   | Producto PCR |
|----------------------|--------|---|--------------|
| <i>P. falciparum</i> | FAI1   | TTA AAC TGG TTT GGG AAA ACC AAA TAT ATT<br>(Tm: 53°C )  | 205pb        |
|                      | FAI2   | ACA CAA TGA ACT CAA TCA TGA CTA CCC GTC<br>(Tm:60 °C )  |              |
| <i>P. vivax</i>      | VIV1   | CGC TTC TAG CTT AAT CCA CAT AAC TGA TAC<br>(Tm: 59° C ) | 120pb        |
|                      | VIV2   | ACT TCC AAG CCG AAG CAA AGA AAG TCC<br>TTA (Tm: 60 °C)  |              |
| <i>P. malariae</i>   | rMAL 1 | ATA ACA TAG TTG TAC GTT AAG AAT AAC CGC<br>(Tm: 56° C)  | 144 pb       |
|                      | rMAL 2 | AAA ATT CCC ATG CAT AAA AAA TTA TAC AAA<br>(Tm: 51°C)   |              |

Los clones seleccionados se sembraron en 1 ml de medio líquido selectivo (LB con ampicilina) y se incubaron en agitación toda la noche a 37°C. Para purificar los plásmidos se utilizó el sistema comercial “UltraClean®Standard Mini Plasmid Prep Kit” (MO-BIO). Finalmente, mediante PCR anidada se comprobó que el tamaño de cada inserto era el esperado, usando cebadores universales y específicos (Tabla 3)

Los productos de PCR fueron corridos en un gel de agarosa al 2%, 100 voltios por 90 minutos y teñidos con bromuro de etidio (1ug/ml), el tamaño de los productos se determinó usando como patrón de peso molecular 100pb de Gentech. Los geles fueron visualizados en el analizador de imágenes Gel Doc XR® usando el software Quality one, versión 4.6.2 para Windows® de Bio-Rad®.

### 3.11. Análisis estadístico

Los datos obtenidos se tabularon en Excel y luego se analizaron por medio de estadística descriptiva en el programa SPSS Versión 18.

### 3.12. Aspectos éticos

Para todos los procedimientos se tuvieron en cuenta las consideraciones éticas y los principios de la declaración de Helsinki (World Medical

Association; 2000), las normas del Ministerio de Salud de Colombia, Resolución 008430 de 1993 (Ministerio de Salud. Dirección de desarrollo científico y tecnológico. Normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud). Resolución No. 008430 de 1993. Santafé de Bogotá: Imprenta Nacional; 1993. ).

Se elaboró de acuerdo con lo estipulado en esta resolución, un documento que fue entregado, previa lectura y explicación de la naturaleza, beneficios y riesgos de la participación en el estudio, a cada uno de los pacientes elegibles o a sus padres en caso de ser menores de edad, y un formato en el que el paciente elegible o su padre o adulto confirmó, mediante su firma, su disposición de participar. (Anexo 3)

### **3.13. Mantenimiento de la información**

Se llevó un control y registro de los casos de malaria analizados en laboratorio, lo cual permitió determinar la prevalencia de malaria según el tipo de *Plasmodium*, organizados en la base de datos del paquete estadístico SPSS 18.0.

### **3.14. Análisis de variables socio-demográficas**

Se evaluó la distribución de los casos según edad, sexo y procedencia, y la relación entre estas variables.

Se utilizó básicamente la fuente primaria, a través de la aplicación de una encuesta realizada a los pacientes, en el periodo de estudio. La encuesta contenía preguntas relacionadas con las características socioeconómicas de interés: edad, sexo y procedencia. La encuesta fue validada previa prueba piloto para garantizar la validez metodológica (Anexo 4).

### **3.15. Plan de análisis**

El total de encuestas realizadas a los pacientes en estudio fueron recibidas en la Facultad de Ciencias de la Salud de la Universidad de Córdoba, para su tabulación. El manejo estadístico de las variables de

interés se hizo con la aplicación del paquete estadístico SPSS 18.0 para el cruce de variables epidemiológicas por medio de Chi-cuadrado, con un nivel de significancia del 5% y un intervalo de confianza del 95%, la información fue organizada en tablas y gráficas para su respectivo análisis.

### 3.16. Confidencialidad.

Toda la información recolectada de los voluntarios fue manejada con estricta confidencialidad. Para evitar los riesgos de pérdida de confidencialidad, en el momento de firmar el consentimiento, a cada voluntario se le asignó un código y solo personal autorizado podrá acceder a esta información. En el caso de los sueros almacenados, correspondientes a pacientes que participaron en otros estudios, los datos fueron entregados al investigador, bajo un código de identificación que reemplace el nombre del voluntario.

### 3.17. Cronograma de Actividades.

| ACTIVIDADES/TIEMPO(Mes)    | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| Recolección de muestras    |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Procesamiento de muestras  |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Lectura de GG y ESP        |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| PCR anidada multiplex      |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Elaboración primer informe |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Análisis de resultados     |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Reportes                   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |
| Publicaciones              |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |    |    |

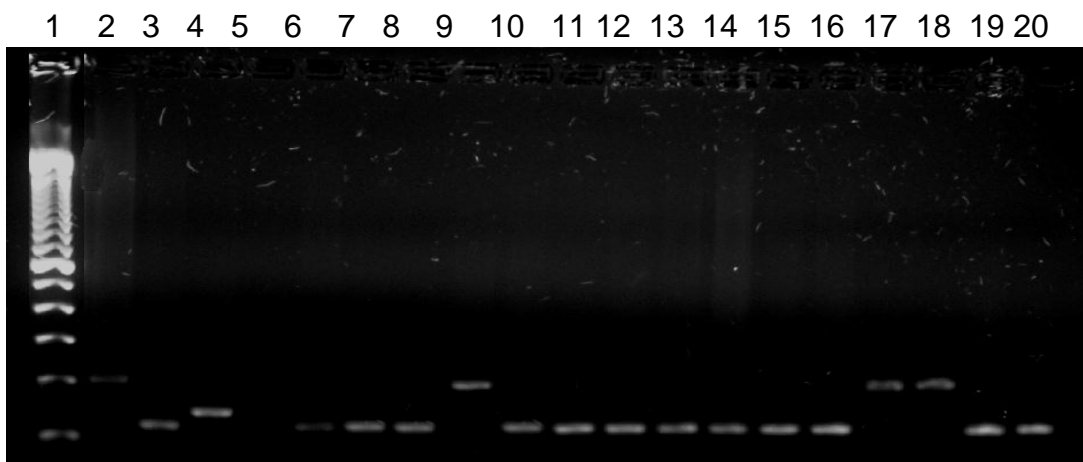
## 4. RESULTADOS

El principal resultado de este estudio es la ausencia de *Plasmodium malariae* circulante en las muestras analizadas. Del total de las muestras (220) ninguna mostró resultado positivo por gota gruesa, ESP y nmPCR para esta especie. Sin embargo esto no descarta la presencia del parásito en la zona analizada. A pesar de ello este estudio permitió el avance para la implementación de esta técnica en estudios posteriores.

### 4.1. Estandarización de nmPCR con primers de *P. malariae*

Uno de los principales logros de este estudio fue la estandarización de la PCR multiplex anidada, incluyendo Primers específicos para *Plasmodium vivax*, *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium malariae* (Tabla 3) el cual era visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa, revelada en fotodocumentador BioRad® (Figura 9).

En Colombia, actualmente se implementa nmPCR incluyendo primers para las dos especies principales, sin embargo el grupo investigativo logró obtener resultados favorables incluyendo el primer *P. malariae*, los cuales a pesar de tener temperaturas de anillamiento diferentes, encontraron un punto común de temperatura en 62°C.



**Figura 7.** Gel de electroforesis – **Carril 1:** PM; **Carril 2:** C+ *P. falciparum*; **Carril 3:** C+ *P. vivax*; **Carril 4:** C+ *P. malariae*; **Carril 5:** Control Negativo; **Carril 6-20:** Muestras analizadas



A pesar de que no se logró determinar la prevalencia de *Plasmodium malariae* circulante, se hizo necesario el análisis de los datos socio-demográficos recolectados como la edad, el sexo y la procedencia, para correlacionarlos con los resultados obtenidos mediante los procesos moleculares. Esto debido al hallazgo de información de importancia que permiten reafirmar la tesis planteada, la cual va enfocada al posible sub-diagnóstico que se tenga de esta especie parasitaria.

#### 4.2. Procedencia de las muestras

Teniendo en cuenta el número de casos de malaria notificados a la Secretaría de Salud Departamental en el último año, se estimó una muestra mínima de 194 pacientes, calculada con un nivel de confianza del 95% y un margen de error de 0,05. Sin embargo por conveniencia se tomaron 220 muestras en los municipios descritos para el estudio. Las muestras fueron recolectadas en los municipios de Tierralta, Montelibano, Puerto Libertador y Moñitos, distribuidas como lo indica la Tabla 4.

**Tabla 4.** Distribución de las muestras por municipios

| <b>Municipio</b>  | <b>Muestras</b> | <b>%</b> |
|-------------------|-----------------|----------|
| Tierralta         | 65              | 29,5%    |
| Puerto Libertador | 79              | 35,9%    |
| Montelibano       | 54              | 24,5%    |
| Moñitos           | 22              | 10,0%    |
| <b>Total</b>      | 220             | 100%     |

Durante el proceso de recolección de muestras, por situaciones ajenas y fuera del alcance de los desarrolladores del proyecto, 9 de las muestras fueron recibidas sin su respectiva ficha Clínico-Epidemiológica, situación que conlleva al desarrollo de un análisis estadístico partiendo de un n= 220 pero incluyendo estas muestras con la casilla No Reporta (NR).

#### 4.3. Niveles de Parasitemia

Luego de realizada la lectura microscópica de las gotas gruesas, se pudo establecer un promedio de parasitemia de 5007 parásitos/uL con un máximo y un mínimo de 33.290 Parásitos/uL y 40 Parásitos/uL (Tabla 5).

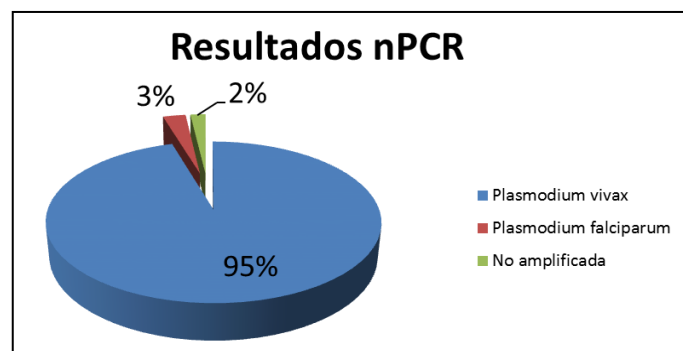
Conociendo la procedencia y el valor de la parasitemia, se logró establecer una relación entre estas dos variables, descritas en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Relación entre la procedencia y niveles de parasitemia (Parásitos/uL)

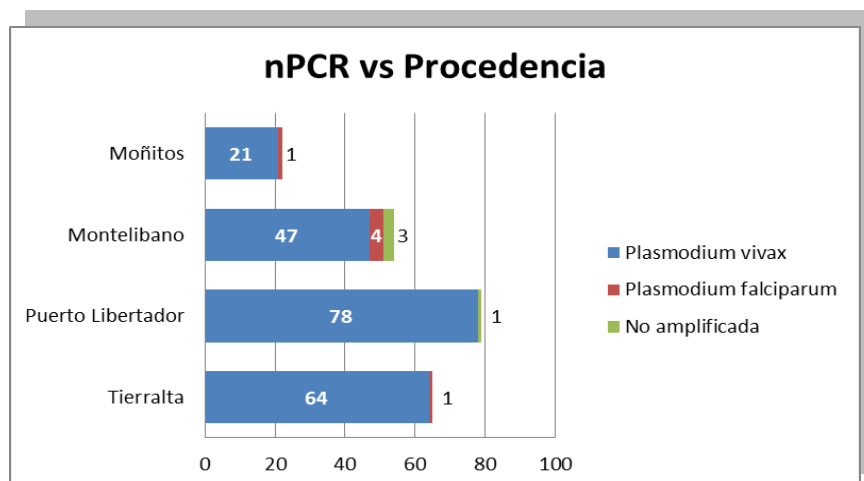
| Municipio         | Promedio | Máximo | Mínimo |
|-------------------|----------|--------|--------|
| General           | 5.007    | 33.290 | 40     |
| Tierralta         | 5.461    | 23.104 | 400    |
| Puerto Libertador | 5.743    | 33.290 | 40     |
| Montelibano       | 3.363    | 13.360 | 80     |
| Moñitos           | 9.275    | 13.360 | 3.820  |

#### 4.4. Resultados de nmPCR por especie

Con esta técnica se logró obtener la clasificación según la especie donde el 95% (210 muestras) fueron *Plasmodium vivax*, 3% (6 muestras) *Plasmodium falciparum*, 2% (4 muestras) no amplificadas y ninguna muestra amplificó para *Plasmodium malariae* (Figura 8). De igual manera se logró establecer una relación entre la procedencia y los resultados por nmPCR de las muestras (Figura 9).



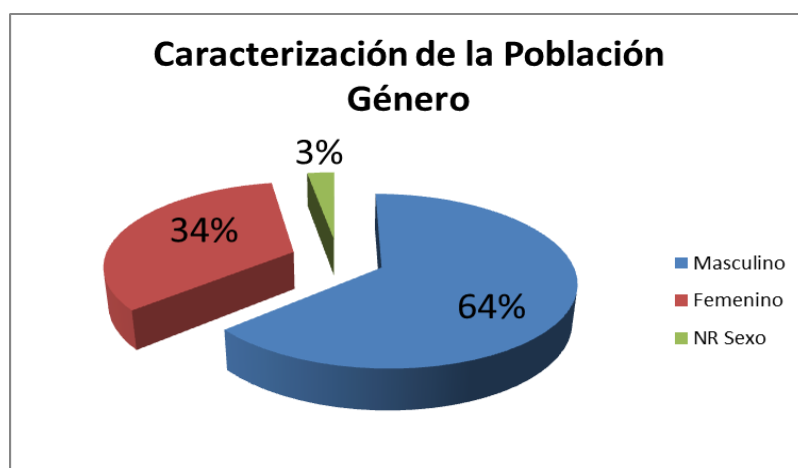
**Figura 8.** Resultados por nmPCR de las muestras recolectadas.



**Figura 9.** Relación entre la procedencia y la especie parasitaria.

#### 4.5. Caracterización de la población conforme al sexo.

Con el análisis de las encuestas, es posible establecer la distribución de los pacientes por sexo, donde el 64% fueron hombres, 34% mujeres y el 3% no reportaron sexo en su ficha (Figura 10). Del total de muestras recibidas también se estableció la distribución relacionada con la procedencia y el sexo (Tabla 6).



**Figura 10.** Distribución de la población por sexo.

**Tabla 6.** Distribución de la población por sexo y procedencia.

| Municipio              | Masculino | Femenino | Total      |
|------------------------|-----------|----------|------------|
| Tierralta              | 20% (43)  | 10% (22) | 65         |
| Puerto Libertador      | 23% (51)  | 13% (28) | 79         |
| Montelibano            | 18% (39)  | 7% (15)  | 54         |
| Moñitos                | 3% (7)    | 4% (9)   | 16         |
|                        | 66% (140) | 34% (74) | 214        |
| Procedencia/NR<br>sexo | 3% (6)    |          | 6          |
| <b>TOTAL</b>           |           |          | <b>220</b> |

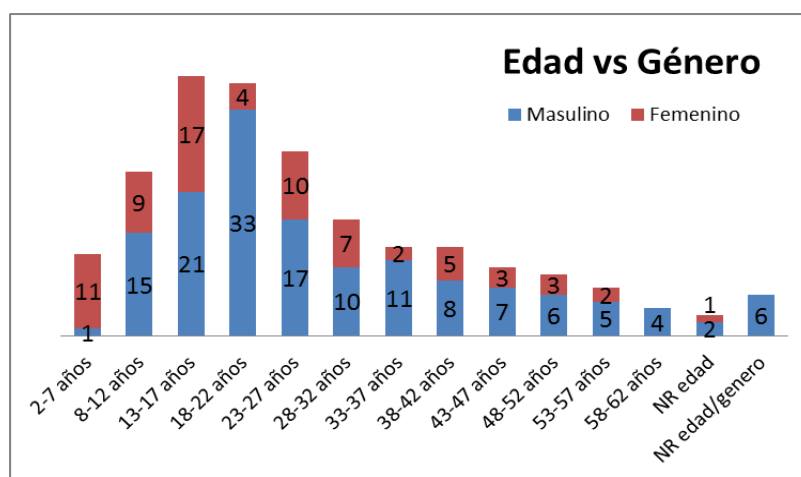
#### 4.6. Caracterización de la población por edad

Así mismo es posible clasificar la población por edad, en el que se evidencia un promedio de 25 años y un rango general que va desde los 2 a los 65 años, observando mayor porcentaje en el entre los 18 y los 27 años (Tabla 7).

Conociendo las variables de edad y sexo, también es posible establecer una relación entre la Edad y el sexo observando mayor presencia de infectados en los hombres desde los 8 a los 27 años. Por su parte las mujeres presentaron mayor afectación entre los 2 y los 17 años (Figura 11).

**Tabla 7.** Distribución de la población por edad.

| Edad         | Total      | %           |
|--------------|------------|-------------|
| 2-7 años     | 12         | 5%          |
| 8-12 años    | 24         | 11%         |
| 13-17 años   | 38         | 17%         |
| 18-22 años   | 37         | 17%         |
| 23-27 años   | 27         | 12%         |
| 28-32 años   | 17         | 8%          |
| 33-37 años   | 13         | 6%          |
| 38-42 años   | 13         | 6%          |
| 43-47 años   | 10         | 5%          |
| 48-52 años   | 9          | 4%          |
| 53-57 años   | 7          | 3%          |
| 58-62 años   | 4          | 2%          |
| NR edad      | 9          | 4%          |
| <b>Total</b> | <b>220</b> | <b>100%</b> |



**Figura 11.** Clasificación de la población por Edad y sexo.

## 5. DISCUSIÓN

El análisis de los datos obtenidos en este estudio permite establecer una similitud con los datos manejados por las autoridades de salud en Colombia, superando en  $\pm 4\%$  la distribución de casos por sexo. Adicional evidencia la mayor afectación de las edades entre los 2 y los 17 años de edad, tal y como lo expone el Instituto Nacional de Salud en su más reciente reporte del evento “Malaria” (INS, 2014)

En todo sentido el tema *Plasmodium malariae* abre una discusión importante con relación a su diagnóstico. Por un lado se habla sobre la gran similitud microscópica que tiene esta especie con *Plasmodium vivax*, lo cual siempre ha apuntado al ya conocido término de sub-diagnóstico, por otro lado la implementación de gota gruesa, tiende a ser un poco infructuosa debido a que en la mayoría de los casos las infecciones con *Plasmodium malariae* cursan con parasitemias bajas pasando desapercibidos incluso reportadas con resultados negativos (Guerrero IC, et al, 1983).

De otra parte los altos costos relacionados con los procesos moleculares para el diagnóstico de malaria, han impedido que en muchos países se tenga un panorama certero en cuanto a esta especie (Rachida et al, 1997)

Durante el 2014, en Colombia se han reportado 8 casos de *Plasmodium malariae* (SIVIGILA, 2014), esta situación trae consigo ciertos interrogantes enfocados principalmente en el método diagnóstico empleado para ello. En primer lugar debido a que desafortunadamente en Colombia los esfuerzos sólo se han concentrado en el diagnóstico de *P. vivax* y *P. falciparum*, situación que ha llevado a dejar de lado la especie objeto de estudio, tal y como ha pasado en otras partes del mundo. Es por ello que en la actualidad no se cuenta con talento humano entrenado en la identificación microscópica de *P. malariae* (sumado a la similitud

microscópica con *P. vivax*, lo cual dejaría entrever el desinterés por una especie que de ser así no solo estaría afectando a 8 pacientes anualmente sino a muchos más diagnosticados posiblemente con infección por *Plasmodium vivax*.

Tan solo un estudio, desarrollado en la costa pacífica colombiana, ha demostrado la presencia de más de 60 casos de pacientes que han estado expuestos al parásito *Plasmodium malariae*, esto a través de la identificación de anticuerpos específicos contra esta especie, el autor de este trabajo científico no descarta la presencia del mismo en otras regiones del país. (Vergara et al, 2001)

De otra parte, la presencia de muestras no amplificadas para ninguna especie, no descarta la presencia del parásito en un 100%, por ello se hace necesario evaluar las posibles fallas y limitaciones que pueda tener esta técnica. La PCR es un método con alto grado de sensibilidad para la detección de malaria mixta y de igual manera en casos de bajos niveles de infección, siendo visiblemente superior a la microscopía convencional, sin embargo también esta técnica depende directamente de la calidad del ADN parasitario obtenido de la sangre de pacientes (Kézia et al, 2004)

Un mal procedimiento en la extracción del ADN parasitario, podría ser causal de la no amplificación de los fragmentos de interés. Es por ello la importancia que tienen inmersas las buenas prácticas en el laboratorio.

La nueva guía de procedimientos para el evento malaria, está enfocada a fortalecer la gota gruesa como alternativa de diagnóstico, o también llamada en varias partes del mundo "Gold Standart"; sin embargo se hace necesaria la implementación del extendido de sangre periférica ya que este permite una visualización "más limpia" del parásito y su disposición dentro del glóbulo rojo parasitado. Este último parámetro contribuye en gran medida en el diagnóstico ya que *Plasmodium malariae* tiene una disposición y forma especial en el glóbulo rojo.

## 6. CONCLUSIONES

Con el desarrollo de este trabajo de investigación se logró evidenciar diferentes aspectos relacionados con el diagnóstico de malaria en el país y la necesidad volver la mirada a una especie parasitaria subestimada, la cual puede surtir grandes efectos en la salud de las personas.

El grupo investigativo concluye que aunque no se encontró *Plasmodium malariae* en las muestras analizadas, no se puede descartar la presencia de esta especie parasitaria en esta zona del país.

Con base en lo anterior no es posible establecer la prevalencia y el patrón de comportamiento de esta especie parasitaria en zonas endémicas para malaria en el departamento de Córdoba.

Es necesaria la implementación del extendido de sangre periférica, acompañando la gota gruesa para dar un buen diagnóstico de malaria.

El éxito del procedimiento de la nmPCR radica principalmente en la extracción del ADN parasitario.

El grupo etario entre los 8 y los 27 años del sexo masculino fue el más afectado por malaria, en segunda instancia las mujeres entre los 2 y los 17 años.

Se requiere un entrenamiento especial a microscopistas para el diagnóstico de malaria por *Plasmodium malariae* además de la implementación de técnicas que permitan la identificación de esta especie parasitaria.



## 7. RECOMENDACIONES

En caso de que se quiera continuar con este estudio, el grupo investigativo recomienda:

Ampliar la población de estudio, fundamentados en el número de casos reportados en el departamento de Córdoba al Sistema Nacional de Vigilancia y Control en Salud, SIVIGILA.

Estudiar la posibilidad de realizar un análisis serológico que permitan la identificar el contacto con esta especie parasitaria, tal y como se desarrolló en el Valle del Cauca.

Utilizar métodos de extracción de ADN parasitario de mayor sensibilidad y especificidad que permitan la conservación del mismo y que reduzca el margen de error.

Realizar un entrenamiento previo al personal microscopista en los diferentes municipios, enfocados al diagnóstico de *Plasmodium malariae* por parte de las autoridades de salud departamental.

Indagar sobre el método de diagnóstico usado por las autoridades de salud para la identificación de los casos de “Malaria malariae” en el país.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Bruce-Chwatt LJ. Blood transfusion and tropical disease. Trop Dis Bull, 1972;69:825-62.
- CDC, 2010. Malaria: A Reemerging Disease in Africa. Center of Disease Control and Prevention, Atlanta. Available from <http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/3/98-0313>
- Collins, 2007. Collins WE and Jeffery GM. *Plasmodium malariae*: parasite and disease. Clin Microbiol Rev 2007;20:579-92.
- Greenwood, B. and P. Alonso (2002). "Malaria vaccine trials." Chem Immunol 80: 366-95.
- Guerrero IC, Weniger BG, Schultz MG. Transfusion malaria in the United States, 1972-1981. Ann Intern Med 1983;99:221-6.
- Hans-Peter, Paul Swoboda, Josef Harl, High prevalence and genetic diversity of *Plasmodium malariae* and no evidence of *Plasmodium knowlesi* in Bangladesh, *Parasitology Research*, 2014, 113, 4, 1537
- Hedelius Richard, James J. Fletcher, William F. Glass II (2014) International Society of Travel Medicine, Nephrotic Syndrome and Unrecognized *Plasmodium malariae* Infection in a US Navy Sailor 14 Years After Departing Nigeria Journal of Travel Medicine 2011; Volume 18 (Issue 4): 288–291
- INS, 2011. Instituto Nacional de Salud, República de Colombia, Grupo Enfermedades Trasmisibles. Equipo Funcional Vectores. Protocolo de Vigilancia y Control de Malaria. 2011: Bogotá. p. 1-16.

- INS, 2013. Instituto nacional de salud de Colombia (2013). Informe del evento paludismo, hasta el doceavo periodo epidemiológico del año 2013. Bogotá.
- INS, 2014. Instituto nacional de salud de Colombia (2014). Informe del evento Malaria hasta el periodo IX de 2014. Bogotá.
- Kézia KG Scopel, Cor JF Fontes, Álvaro C Nunes, Maria de Fátima Horta and Érika M Braga. Low sensitivity of nested PCR using *Plasmodium* DNA extracted from stained thick blood smears. *Malaria Journal* 2004. Available from <http://www.malariajournal.com/content/3/1/8>
- Krogstad DJ. *Plasmodium* species (malaria). In Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas and Bennett's principles and practice of infectious disease*. 4th ed. Vol. 2. New York: Churchill Livingstone, 1995:2415-27.
- Krotoski, W. A. (1985). "Discovery of the hypnozoite and a new theory of malarial relapse." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 79(1): 1-11.
- Laveran, A. 1880. Note sur un nouveau parasite trouve` dans le sang de plusieurs malades atteints de fie`vre palustre. *Bull. Acad. Med.* 9:1235–1236
- Mendis, K. N. and R. Carter (1995). "Clinical disease and pathogenesis in Malaria." *Parasitology Today* 11(5): 2-12.
- Miller, L. H., S. J. Mason, et al. (1976). "The resistance factor to *Plasmodium vivax* in blacks. The Duffy-blood-group genotype, FyFy." *N Engl J Med* 295(6): 302-4.
- PAHO, 2003. "Informe de la Situación de los Programas de Malaria en las Americas." CD44/INF/5.

- PAHO, 2010. "Informe de la Situación de los Programas de Malaria en las Americas." CD44/INF/3.
- Rachida Tahar, Pascal Ringwald and Leonardo K. Basco. Diagnosis of *Plasmodium malariae* by polymerase chain reaction. The royal society of tropical medicine and hygiene (1997) 91,410-411
- Sedigheh Zakeri, Gabriella Lindergard, Rhiannon M. Davies, Christian Boudin, et al. (2006) Identification and typing of Cameroonian isolates of *P. malariae* using monoclonal antibodies against *P. brasilianum*. Available from: 10.1016/j.actatropica.2006.08.004
- Sinden, R. E. (1999). "Plasmodium differentiation in the mosquito." Parasitologia 41(1-3): 139-48.
- Singh, B., et al., *A genus- and species-specific nested polymerase chain reaction malaria detection assay for epidemiologic studies*. Am J Trop Med Hyg, 1999. 60(4): p. 687-92.
- SIVIGILA, 2014. Sistema de Vigilancia y Control en Salud Pública de Colombia (2014). Informe Epidemiológico semana 42 de 2014. Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2014%20Boletin%20epidemiologico%20semana%2042.pdf>
- Snounou, G., et al., *High sensitivity of detection of human malaria parasites by the use of nested polymerase chain reaction*. Mol Biochem Parasitol, 1993. 61(2): p. 315-20.
- Tangpukdee N., Thanachartwet V., Krudsood S., et al. Minor liver profile dysfunctions in *Plasmodium vivax*, *P. malariae* and *P. ovale* patients and normalization after treatment. Korean Journal of Parasitology, 2006, Vol. 44, No. 4: 295-302.

- Trigg, P. and A. Kondrachine (1998). The current global malaria situation. In Malaria: parasite biology, pathogenesis and protection. I. Sherman. Washington, ASM Press: 11-22.
- Vergara Juana, Silvia Hurtado, Victor Alvarez, Mirian Arevalo, Socrates Herrera. Caracterización de la transmisión de *Plasmodium malariae* en cuatro regiones colombianas endémicas de malaria. Biomédica 2001; 21:53-61
- WHO, 2012. World malaria report 2012, World Health Organization 2012, Geneva.
- WHO, 2013. World malaria report 2012, World Health Organization 2012, Geneva.
- Wyler, D. J. (1993). "Malaria: overview and update." Clin Infect Dis 16(4): 449-56.
- Yun Ji Hong, Sun Young Yang, Kyunghoon Lee, A Case of Imported *Plasmodium malariae* Malaria (2012), Annals of Laboratory Medicine. Available from <http://synapse.koreamed.org/DOLx.php?id=10.3343/alm.2012.32.3.229>

## **9. ANEXOS**

**Anexo 1.** Protocolo de Extracción de ADN parasitario por el método de Chelex.

**Anexo 2.** Protocolo de nmPCR para el diagnóstico molecular de especies de *Plasmodium sp.*

**Anexo 3.** Consentimiento y Asentimiento informado para la participación en el estudio.

**Anexo 4.** Ficha Clínico-Epidemiológica para la recolección de datos de los participantes